



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

«مدیریت پژوهشی»

عنوان طرح پژوهشی:

« تعیین پلی مرفیسم انگل لیشمانیای جلدی موجود در گسترش های جمع آوری شده از نمونه

انسانی به روش PCR-RFLP در استان بوشهر»

مجری طرح :

حسین دارابی - دکتر مهدی محبعلی - دکتر هما حجاران - دکتر مراد علی فولادوند - دکتر عبدالمحمد

خواجه ثیان

همکاران طرح :

امید غریبی - سروره چاره دار - عبدالرسول فروزانی - فروغ پاکباز - محمدرضا عبایی - مسعود جمالی

سال ۱۳۸۹

فهرست:

۱	خلاصه
۲	مقدمه
۳۶	روش کار
۴۸	یافته ها
۵۳	بحث و نتیجه گیری
۵۸	رفرنس

خلاصه فارسی :

لیشمانیوز جلدی یکی از مهمترین بیماریهای عفونی- انگلی جهان می باشد. این بیماری در بیش از نیمی از استان های ایران از جمله استان بوشهر به عنوان مشکل بهداشتی مطرح می باشد. بررسی جنبه های اپیدمیولوژیک بیماری و تعیین هویت نوع انگل در انسان در ارائه برنامه کنترل اهمیت زیادی دارد.

این مطالعه توصیفی در سال ۱۳۸۸ بر روی تمامی موارد مشکوک به سالک که به مراکز بهداشتی درمانی استان بوشهر مراجعه کردند صورت گرفت. تشخیص بیماری بر اساس معاینه بالینی و مشاهده میکروسکوپی انگل در ضایعات صورت گرفت. خصوصیات دموگرافیک و سایر مشخصات بیماری همچون سن، جنس، محل سکونت، تعداد ضایعه و محل ضایعه در فرم اطلاعاتی ثبت گردید و از مواردی که دارای ضایعه پوستی بودند نمونه برداری صورت گرفت. گسترش های رنگ آمیزی شده با گیمسا در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی (۱۰۰X) مورد بررسی قرار گرفته و لام های مثبت بر اساس تعداد انگل لیشمانیا در شان میکروسکوپی درجه بندی شدند. DNA لیشمانیا موجود بر روی لام به طور جداگانه تخلیص و به روش ITS1-PCR آزمایش شدند. با استفاده از پرایمر های اختصاصی قطعه (ITS1) Internal transcribed spacer ریبوزومی تکثیر یافت. محصولات PCR به وسیله آنزیم محدود کننده HaeIII هضم شد. محصول نهایی در ژل آگارز ۳٪ الکتروفورز شد و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید باندهای ایجاد شده بر روی دستگاه UV transilluminator مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصله با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS11.5 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

در بررسی میکروسکوپی در ۴۳ گسترش رنگ آمیزی شده با گیمسا میزان پارازیتمی ۱+ تا ۴+ تعیین گردید. که در ۲۷ نمونه (۶۳٪) نتایج آزمایش PCR مثبت شدند. پس از آزمایش PCR-RFLP از میان ۲۱ نمونه ای که گونه آنها تعیین گردیده بود ۶۶/۷٪ لام ها L.major و ۳۳/۳٪ L.tropica بودند. در این بررسی گونه غالب در استان بوشهر لیشمانیا ماژور بود.

مقدمه:

لیشمانیازیس یکی از نه بیماری است که مورد توجه بخش تحقیقات گرمسیری سازمان بهداشت جهانی بوده و از هر گونه مطالعه و فعالیت آموزشی- پژوهشی مربوط به آن ها خصوصاً در کشورهای اندمیک این بیماری ها پشتیبانی می کند. تقریباً یک میلیون پانصد هزار مورد جدید لیشمانیوز هر سال در جهان گزارش می شود که یک کمیلون نفر آن نوع جلدی و بقیه انواع احشائی می باشند بدلیل گسترش جغرافیایی بیماری، تغییر الگوی مسافرتها بین المللی و مهاجرت جمعیتها (مهاجرت مردم غیر ایمن به مناطق اندمیک و یا مردم آلوده به مناطق غیر اندمیک) شیوع بیماری روز به روز در حال افزایش است

بیماری سالک در مناطق گرمسیری امریکا، آفریقا و شبه قاره هند و در نواحی نیمه گرمسیری آسیای جنوب غربی و ناحیه مدیترانه به شکل آندمیک دیده می شود. اگر چه بیماری سالک معمولاً با مرگ و میر بالائی همراه نیست ولی میزان ابتلاء بالا و ایجاد ضایعات بد شکل پوستی که در برخی موارد تا بیش از یکسال باقی می ماند و جوشگاه (اسکار) پس از بهبودی آن نیز که حتی با درمان استاندارد تا آخر عمر وجود دارد، قابل توجه است و موجب اذیت و آزار بیمار می گردد. از طرف دیگر عوارض باکتریائی ثانویه شامل عفونت نسوج سطحی و عمقی، آبسه، سپتی سمی، و عفونت های ناشی از باکتری های بی هوازی و حتی کزاز از عوارض زخم سالک می باشد که ممکن است موجب ناتوانی و حتی مرگ بیمار گردد. اگر چه میزان بروز این عوارض ناچیز است ولی با توجه به گستردگی بیماری سالک احتمالاً تعداد بیمارانی که دچار این عوارض می گردند قابل توجه خواهند بود (۱).

سالانه ۱۵۰۰۰۰۰ نفر در دنیا به به فرم پوستی لیشمانیوز مبتلا می شوند که بسیاری از آنها ثبت و گزارش نمی شوند. این بیماری در برخی موارد ایجاد ضایعات متعدد (تا بیش از ۳۰۰ عدد) کرده است. بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی در ۸۸ کشور بیماری لیشمانیا انتشار دارد و بیش از ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلا هستند، و حدس زده می شود ۱۲ میلیون نفر آلوده می باشند، بعلاوه بیش از ۹۰٪ موارد لیشمانیوز جلدی

در ۹ کشور جهان منجمله ایران وجود دارد. همچنین در کشورهای دیگر مانند افغانستان، ونزوئلا و ترکیه لیشمانیوز پوستی در حال افزایش است (۲)

گرچه سالانه حدود بیست هزار مورد بیماری لیشمانیوز جلدی در ایران گزارش می شود ولی احتمالاً موارد حقیقی حدود ۴ تا ۵ برابر آن است (۳)

عامل بیماری :

عامل بیماری لیشمانیازیس انگلهای تک یاخته داخل سلولی از خانواده Trypanosomatidae و جنس لیشمانیا می باشد. حدود ۲۰ گونه لیشمانیا برای انسان بیماریزا بوده و عامل بیماری از طریق خونخواری پشه خاکی های جنس فلبوتوموس در دنیای قدیم و لوترومیا در دنیای جدید منتقل می شوند عامل بیماری لیشمانیوز روستایی *Leishmania major*، عامل بیماری لیشمانیوز نوع شهری *Leishmania tropica* و عامل لیشمانیوز احشایی *leishmania infantum* می باشد (۱)

در طی سالیان گذشته محققین از روشهای گوناگونی جهت طبقه بندی انگل های لیشمانیا استفاده کرده اند از جمله روش ایزو آنزیم، روشهای بیوشیمیایی و روشهای RFLP و RAPD-PCR که در حال حاضر روش تاکسونومی بر اساس جایگاه تکثیر انگل لیشمانیا در حشره ناقل و آنالیز ایزوآنزیم های آن مورد قبول اکثریت می باشد. (۴)

ناقل:

پشه خاکیها پراگندگی وسیعی در مناطق گرمسیری ونیمه گرمسیری دارند گونه هایی نیز در مناطق معتدل جهان یافت می شوند پشه خاکیها حشراتی به اندازه ۳/۵-۱/۵ میلی متر، به رنگ زرد با بدنی مودار چشمانی نسبتاً بزرگ و سیاه رنگ، فاقد چشم ساده و با پاهاى نسبتاً بلند و باریک می باشند

پشه خاکی ماده در هر بار تخمگذاری ۷۰-۳۰ تخم به صورت تک تک در محلهای تاریک، مرطوب دور از تغییران شدید جوی و غنی از مواد آلی در حال فساد مانند لانه جوندگان خاکریز موریانه ها لانه حیوانات و شکاف غارها کف جنگل و ... قرار می دهد تخم این حشرات بیضی شکل بوده و اندازه آن ۰/۴ - ۰/۳ میلی متر است

از زمان تخمگذاری تا خروج بالغ ۴۰-۲۰ روز طول می کشد

جفتگیری قبل و یا بعد از خونخواری در هر هنگام از روز یا شب انجام می شود پشه خاکیها نر و ماده هر کدام بیش از یک مرتبه جفتگیری می کنند هر دو جنس نر و ماده وترشحات گیاهان و عسلک ترشح شده از شته ها و شپشک ها تغذیه می کنند پشه خاکیهای ماده بمنظور رشد و نمو تخم از خون تغذیه می کنند پشه خاکیها ماده در هر نوبت تخمگذاری به یک یا چند بار خونخواری از انسان و سایر حیوانات خونگرم نیاز دارند گزش هنگام شب از موقع غروب تا طلوع آفتاب صورت می گیرد.

پشه خاکیها دارای خونخواری منقطع می باشند و برای تکمیل خونخواری ممکن است چندین بار میزبان را مورد گزش قرار دهند که در صورت آلوده بودن زخم های متعدد ایجاد می شود.

فلبوتومها در هر نوبت ۰/۵ میلی گرم خون می خورند هضم خون بر حسب شرایط محیط (درجه حرارت و رطوبت) ۳-۵ روز طول می کشد و تخم ها ۱-۲ روز بعد می رسند تخمگذاری ۳-۸ روز پس از خونخواری صورت می گیرد.

پشه خاکیها پرواز کنندگان پرقدرتی نیستند و دارای پروازهای جهتی کوتاه بوده و در هر بار بیش از نیم متر بلند نمی شوند پشه خاکیها در هنگام شب پرواز می کنند و در یک شب قادرند چند صدمتر در جستجوی میزبان محل استراحت و تکثیر پرواز کنند. (2, 4)

تاکنون در کشور ما بیش از 54 گونه پشه خاکی تشخیص داده شده و آلودگی برخی از آنها به لیشمانیا ثابت شده است. (6)

الف) ناقلین لیشمانیوز جلدی مرطوب (روستایی)

ناقل اصلی آن *Phlebotomus papatasi* است. این گونه مسئول انتقال بیماری به انسان و جوندگان است و *P. caucasicus* . *P. mongolensis* و *p. ansari* نیز بیماری را بین جوندگان منتقل می

کنند(۵و۶). مطالعات انجام شده آلودگی لپتومونایی را در مناطق لطف آباد ترکمن صحرا، اسقرایی، روستاهای اصفهان، اهواز ، دهلران، دزفول، شوش بکران شاهرود، بادرود، نطنز، ورامین و ابردژ در لانه های جوندگان دیده شده است(۸،۶،۵ و ۹)

ب) ناقلین لیشمانیوز جلدی خشک (شهری) :

Phlebotomus sergenti ناقل اصلی لیشمانیوز جلدی نوع شهری می باشد و نقش مهمی را در انتقال بیماری در کانونهای شهری به عهده دارد. فلبوتوموس پاپاتاسی و فلبوتوموس کوکازیکوس که در بعضی کانونهای شهر همراه با سرزنتی در اماکن داخلی و مسکونی دیده می شوند ممکن است به عنوان ناقل ثانویه در انتقال بیماری سهمیم باشند فلبوتوموس سرزنتی در شهرهای شمالی خراسان و دامنه جنوبی البرز و در روستاهای مناطق و شهر تهران و شهرهای اردستان، نائین شیراز، کرمان، کاشان و یزد به صورت اهلی در خانه ها با فراوانی بالا دیده می شود.(۷و۸)

ج) ناقلین لیشمانیوز احشایی :

Phlebotomus major مهمترین ناقل بیماری در اکثر نواحی کشور می باشد. *P. perfiliewi* و *p. kanedelakii* ؛ به عنوان ناقلین احتمالی لیشمانیوز احشایی در مناطق اندمیک بیماری در استان اردبیل و *P.keshishiani* و *P.major* در مناطق قیر و کارزین استان فارس شناسایی شده اند. *P.caucasicus*, *P.alexandri* نیز به عنوان ناقلین لیشمانیوز احشایی مطرح بوده ولی انگل از آنها جدا نشده است(۱۱)

مخازن بیماری لیشمانیوز جلدی مرطوب (روستایی):

مخزن اصلی بیماری در مناطق مرکزی و شمال شرقی عمدتاً *Rhombomys opimus* و در کانونهای اصفهان ، لطف آباد و ترکمن صحرا *Meriones libycus* نیز به عنوان مخزن ثانوی بیماری است(۱۲و۱۳) در استان خوزستان آلودگی طبیعی به *L . major* در *Tatera indica* ، *Nesokia indica* . *M*

libycus و چند مورد سگ دیده شده است در بلوچستان واقع در جنوب شرق ایران *M. hurrianae* مخزن بیماری معرفی شده است در ایلام و کرمانشاه *T.indica* مخزن بیماری است (۱۴ و ۱۵). در آذربایجان شرقی نیز در یک مورد *M. libycus* آلوده گزارش شده است. در شمال نطنز مرینوس لیبیکوس مخزن اصلی بیماری شناسایی و L.major MON-26 از آن جدا شده است (۱۶)

مخازن بیماری لیشمانیوز جلدی خشک (شهری):

انسان بیمار را به عنوان مخزن اصلی لیشمانیوز پوستی نوع شهری می دانند و انتقال انسان به انسان به عنوان اصلی ترین راه انتقال بیماری می باشد. در مطالعاتی که صورت گرفته سگهای خانگی و ولگرد را در تهران، مشهد، شیراز، نیشاپور، بندرعباس و بم آلوده به انگل یافت نموده اند (۱۷)

مخازن بیماری لیشمانیوز احشایی:

مخازن بیماری در ایران سگ سانان (سگ، روباه، و شغال و گرگ) می باشند. در بررسی سرولوژی به روش های IFA و DAT و پارازیتولوژی بر روی ۶۶ حیوان گوشتخوار مشکوک به مخازن بیماری، سگها، شغالها، روباه و موش خرما در کانون اندمیک فیروزآباد و جهرم در سالای ۶۸-۶۹ مشاهده گردید که ۱۹ عدد از آنها (سگ، شغال و روباه) با روشهای فوق الذکر مثبت بودند و در آزمایشات پارازیتولوژیک نیز در سگها، روباهها و شغال انگل دیده شد (۱۸).

در بررسی جوندگان مشکین شهر از استان اردبیل از ۴۱۹ جونده صید شده، در ۱۶,۴ جوندگان جسم لیشمن دیده شد و در کشت طحال ۲ عدد مرینوس پرسیکوس نیز گونه L.donovani Lon.50 تعیین گردید (۱۹). در همین منطقه از کشت طحال یک هامستر طلایی L.infantum Lon.49 جدا و شناسایی گردید (۲۰). در استان بوشهر در شهرستانهای دشتی و تنگستان چهار ایزوله از لیشمانیا اینفانتوم از سه قلاده سگ و یک قلاده شغال جدا گردید (۲۱).

چرخه زندگی انگل در بدن ناقل و میزبان مهره دار

زندگی انگل حداقل دارای دو مرحله اصلی است یک مرحله لیشمانیائی و دیگری مرحله لپتومونائی، در مرحله لیشمانیائی که به آن آماستیگوت می گویند انگل بصورت ارگانیسم فاقد تاژک آزاد با بدن گرد یا بیضوی و گاهی دوکی شکل است که در داخل سلولهای بیگانه خوار (ماکروفاژ) پستانداران وجود دارد و اجسام لیشمن نامیده می شود. وقتی که فرم متاسیکلیک و سایر پروماستیگوت های لیشمانیا از طریق نیش پشه خاکی آلوده وارد بدن شدند فوراً توسط سلولهای فاگوسیت تک هسته ای فاگوسیت شده و درون آنها به شکل غیر متحرک درآمده و پس از مدت کوتاهی به شکل آماستیگوت تغییر شکل می دهند. آماستیگوت ها از طریق تقسیم دوتایی تکثیر می یابند و تعداد انگلها در ماکروفاژها ممکن است به ۴۰ عدد و یا بیشتر برسد که پس از پاره شدن ماکروفاژها های آلوده باعث عفونت ماکروفاژهای سالم می شوند.

مرحله لپتومونائی که به آن پروماستیگوت نیز می گویند از تغییر شکل حالت لیشمانیائی بوجود می آید. در این شکل انگل تاژکی در قسمت قدامی خود دارد که این شکل انگل در دستگاه گوارش پشه خاکی و هم چنین در داخل محیط کشت دیده می شود. پشه خاکی جنس ماده خونخوار است. و با مکیدن خون، آماستیگوت را می بلعد. آماستیگوت در دستگاه گوارش پشه به مرحله پروماستیگوت تبدیل می شود. این شکل ارگانیسم (پروماستیگوت) با تقسیم بندی غیر جنسی دوتایی زیاد می شود و بعد از گذشتن ۴ الی ۱۸ روز تعداد آنها زیاد شده بطوریکه با گزش پشه خاکی ماده آلوده ، این انگل به انسان سالم منتقل شده و باعث بروز زخم سالک می گردد . تعداد پروماستیگوت های لازم جهت ایجاد عفونت لیشمانیایی در میزبان مهره دار نامشخص است ولی به نظر می رسد تعداد ۱۰۰-۱۰۰ پروماستیگوت از طریق گزش پشه خاکی کافی باشد.(۲۳و۲۲).

بطور کلی سالک بوسیله انواع پشه خاکی های ماده آلوده به سه طریق زیر منتقل می شود.

۱-انسان، پشه خاکی، انسان ۲-حیوان، پشه خاکی، حیوان ۳-حیوان، پشه خاکی، انسان و بالعکس

روش های انتقال لیشمانیوز جلدی (سالک)

عمده ترین روش انتقال سالک گزش پشه خاکی است ولی راه های فرعی دیگری نیز گزارش شده که شامل خاراندن زخم و انتقال مکانیکی توسط سایر بندپایان می باشد. (۳)

عفونت در انسان (علائم بالینی) :

پس از گزش پشه خاکی های آلوده معمولاً در نواحی باز بدن زخم ها ظاهر می شوند. بطوریکه صورت شایعترین محل ایجاد ضایعه در بچه هاست در حالی که در بزرگسالان سایر اعضا بدن بیشتر دچار زخم های سالک می گردند. گونه های لیشمانیا ماژور ، لیشمانیا تروپیکا، لیشمانیا اتیوپیکا و لیشمانیا اینفانتوم، عوامل ایجاد لیشمانیوز جلدی در دنیای قدیم هستند. البته لیشمانیا دونووانی که عامل لیشمانیوز احشایی است، ایجاد ضایعات جلدی نیز می نماید. هر کدام از این گونه ها دارای علائم بالینی خاص خود می باشند که گاهی این علائم هم پوشانی دارند و به همین دلیل فقط با مشاهده علائم بالینی نمی توان گونه عامل بیماری را دقیقاً مشخص نمود. (۲۳)

با توجه به عامل بیماری و علائم بالینی عفونت در انسان دارای اشکال زیر است :

شکل خشک (شهری) Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis, ACL :

در لیشمانیوز جلدی نوع خشک (شهری) ACL دوره کمون طولانی تر از نوع روستائی و بطور معمول ۲ تا ۸ ماه می باشد. این بیماری دارای مراحل و اشکال بالینی مختلف است.

پس از گذشت دوره کمون در محل گزش پشه، پاپول سرخ رنگی ظاهر می شود این پاپول نرم و بی درد است و در اثر فشار محو نمی شود . گاه خارش مختصری دارد . پس از گذشت چند هفته یا چندماه پاپول فعال شده ، ضایعه بزرگتر شده و اطراف آن هاله قرمز رنگی را فرا می گیرد و کم کم بر اثر تجمع سلول ها در آن، ضایعه سفت می شود . پس از گذشت ۲ تا ۳ ماه پاپول بصورت دانه ای سرخ و برجسته با سطحی صاف و شفاف و قوامی نسبتاً سفت در می آید . در این هنگام در روی آن فرو رفتگی به عمق یک میلیمتر که ته آن پوسته پوسته

است دیده می شود . به تدریج مایع سرروز ترشح می کند و ممکن است ضایعه بصورت زخمی باز در آید . زخم حدودی مشخص و حاشیه ای نامنظم و برجسته دارد که روی آن را دلمه ای کثیف و قهوه ای رنگ پوشانده است .

اگر دلمه کنده شود کف زخم فرو رفته است . اطراف زخم دارای هاله ای صورتی رنگ که در مقایسه با بافت های اطراف و زیر آن سفت به نظر می رسد . ضایعه بی درد و گاهی دارای خارش خفیف است اما در صورت بروز عفونت ثانویه دردناک می باشد . بهبودی زخم بتدریج از مرکز زخم شروع شده و دلمه شروع به خشک شدن می کند . و بهبودی کامل پس از گذشت ۱۲-۶ ماه و گاه بیشتر طول می کشد و ضایعه کاملاً بهبود می یابد و اثر آن به صورت جوشگاهی فرو رفته با حدودی کاملاً مشخص و حاشیه ای نامنظم باقی می ماند..(۲۴و۲۵)

شکل مرطوب (روستائی) Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis, ZCL :

درلیشمانیوز جلدی نوع مرطوب (روستایی) ZCL دوره کمون کوتاهتر از نوع شهری است و معمولاً کمتر از ۴ ماه می باشد.

این شکل بیماری نیز دارای ضایعات بالینی مختلف میباشد. پس از طی دوره کمون ضایعه بصورت جوش همراه با التهاب حاد ظاهر می شود پس از مدتی (چند روز تا چند هفته) زخمی شده که بسرعت بزرگ و دور آن پر خون می گردد. زیر لبه زخم معمولاً برجسته است و دارای ترشح است . بهبودی ضایعه از مرکز و اطراف همزمان اتفاق می افتد و بطور معمول طی مدت ۶-۴ ماه پس از شروع آن کاملاً بهبود میابد اما به ندرت در افراد سالم بیش از این مدت طول می کشد.

در بیماران تعداد متعدد ضایعه حتی بیش از ۲۰۰ ضایعه نیز مشاهده شده است . اشکال متنوع دیگر شامل پوسته پوسته شونده ، شاخی، زگیلی شکل و نیز گزارش شده است . بروز عفونت ثانویه میکروبی ممکن است موجب وخامت بیماری گردد. (۲۶)